

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

## Reference 2

Japanese Patent No. 2977241

Disclosed is an optimized fermentation method (conditions) for producing foreign proteins, specifically lipocortine-related proteins in E. coli under the control of an inducible lac-promoter. The inventor found a novel method in which volumetric yield of the product can be increased by factor of 5 compared with conventional methods by controlling the time and amount of glucose (lactose) addition through which the oxygen partial pressure in the culture medium is maintained at least 10% (i.e. glucose limitation). The yield can further be improved by increasing the oxygen pressure using at least one of the means selected from the followings:

(a) fermentation under up to 2 bar overpress, (b) increasing the stirring rate and the aeration rate up to 2 vpm, and (c) lowering the temperature from 37 to 30 degree C. The advantage of this method is that it does not require particular equipment for aeration of highly pure oxygen and prevention of explosion of the oxygen.

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

第2977241号

(45) 発行日 平成11年(1999)11月15日

(24) 登録日 平成11年(1999)9月10日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

FI

C 1 2 P 21/00

C 1 2 P 21/00

C

// C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A

15/09

15/00

A

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:19)

請求項の数6(全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平2-202616

(22) 出願日 平成2年(1990)8月1日

(65) 公開番号 特開平3-76595

(43) 公開日 平成3年(1991)4月2日

審査請求日 平成9年(1997)6月19日

(31) 優先権主張番号 P 3 9 2 5 5 5 0 . 6

(32) 優先日 1989年8月2日

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 999999999

ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト

ドイツ連邦共和国フランクフルト・ア

ム・マイン (番地なし)

(72) 発明者 マテイーアス・グローテ

ドイツ連邦共和国デー - 3550 マルブル

ク・グラデンバヘルヴエーク65

(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

審査官 新見 浩一

(58) 調査した分野(Int.Cl.<sup>6</sup>, DB名)

C12P 21/00 - 21/02

C12N 15/00 - 15/09

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

EPAT (QUESTEL)

(54) 【発明の名称】 大腸菌中での外来性タンパク製造のための最適化発酵法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中での外来性タンパクの製法であって、IPTGによる誘導及び炭素源としてグルコースを用いる場合に、酸素分圧が10%より大きい又はそれに等しくなるようにグルコース濃度をコントロールすることを特徴とする上記の方法。

【請求項2】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中外来性タンパクの製法であって、炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用される場合に、酸素分圧が10%より大きい又はそれに等しくなるようにラクトース濃度をコントロールすることを特徴とする方法。

【請求項3】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中外来性タンパクの製法であって、

炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用され、更に誘導因子としてIPTGが使用される場合に、酸素分圧が10%より大きい又はそれに等しくなるようにラクトース濃度をコントロールすることを特徴とする方法。

【請求項4】 次の方法の構成要素の少なくとも1つが適用される請求項1、2又は3記載の方法。

(a) 好ましくは2バールまでの、超大気圧下の発酵、

(b) 入力(攪拌速度は増大させること)及び通気速度(2vvmまで)のコントロールされた追跡、

(c) 温度を37℃から30℃のような温度まで低下させること、

(d) 最大値5~10g/lまでの炭素源としての基質のコントロールされた添加、

(e) pH6.7~pH7.3の値にpHをコントロールすること。

【請求項5】 リポコルチンのcDNAを含有する大腸菌株を

3

4

発酵させる請求項 1、2、3 又は 4 記載の方法。

【請求項 6】 cDNA が PP4、PP4-x 又は PP4 の突然変異体及び変異体をコードする請求項 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、lac プロモーター又は改良 lac プロモーター（例えば lac、lrc）を使用して大腸菌中外来性タンパクを製造するための最適化発酵法を記述する。炭素源としてグルコースを用いる初期増殖相の後、（1）グルコース制限下 IPTG によるか又は（2）ラクトースによるか又は（3）ラクトース制限下 IPTG 及びラクトースにより生

10

成物形成の誘導が行われる。グルコース又はラクトースの制限は、酸素分圧が 10% を超えて保たれるようにする。

大腸菌中多種の遺伝子組替タンパクを商業的な量製造することは原理的に周知である。これらのタンパクの発現は、適当な配列をもつマルチコピープラスミド中にコードする cDNA をクローンすることによって可能となる。

20

このことについての発現実験は、普通振盪フラスコ中実施される。この場合遺伝子組替タンパクの収量は、100ml 未満の容量をもつ振盪フラスコ中の培養が用いられるとき普通 50~100mg/l である。

これらの技術を用いて遺伝子組替タンパクの製造に成功することは可能であるが、タンパク濃度及び製造可能な量を明らかに増大させる技術の必要性がある。これらの要件に適合する 1 つの試みが発酵法の開発である。従って本発明の目的は、大腸菌中外来性タンパクの発現のための発酵法の最適化である。

30

該要件が少なくとも部分的には満足されているいくつかのこのような方法が文献に記載されている。これらの場合 lac プロモーターを使用することは、通常 N-末端  $\beta$ -ガラクトシダーゼタンパク ( $\beta$ -Gal) をもつ融合タンパクが製造されたことを意味している。この発酵における収量は普通リットルあたり融合タンパク 0.1~2.0 g である。融合型  $\beta$ -Gal タンパクを考えるとときには、実際の生成物濃度は、該値の 30% に低下することが多い。更に、生成物から  $\beta$ -Gal タンパクを除去するため綿密な精製処理を要する。

40

られ、イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) が誘導のために使用された今日までの方法において生物学的に完全に活性な生成物の 200mg/l の収量を得ることが可能であった。

発酵を最適化するために、本発明は増殖挙動及び生成物形成の改善を課題とした。生成物は細胞の内部に形成されるので、生成物の比濃度 (specific product concentration) (細胞あたり生成物の量) 及び細胞数が重要である。この 2 つの因子の積がリットルあたりグラム (g/l) の方法の容量生産法である。

高細胞密度発酵は、遺伝子組替大腸菌株についてしばしば文献に記載されている。リットル (l) あたり乾燥物 (DM) 30g までの細胞密度がこれに関連して述べられている。原理的に知られているいくつかの手段の組合せにより、遺伝子組替大腸菌 K12 株を 150Aess に対応する 50 g の DM/l の細胞密度まで発酵させる方法を開発することが可能となっている。本発明において本質的な点は、取入れ空気の酸素強化が後述される方法の 1 条件ではないことである。基質としての純酸素は高いコストを生じ、その上、爆発防止手段を省くことが可能であるので、このことは方法の経済性に有利な効果を有する。

高い用量生成物収量をもつ方法について重要な因子は、プロモーターの最適誘導である。IPTG による誘導は、前述した低細胞密度の場合に実施されており、文献に多数記載されている。IPTG (1mM~10mM、好ましくは 5mM) による誘導及び酸素分圧が 10% より大きいか又はそれに等しくなるような基質としてグルコースの制限の後

50

因数 5、0.2g/l から 1.0g/l までの容量収量の改善が達成されることが見出された。

本発明の第 2 の実施態様は、炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトースを用いる増殖の場合の生成物形成の誘導よりなる。酸素分圧は、ラクトースの添加をコントロールすることによって上と同様に 10% より大きいか又はそれに等しい水準に保たれた。ラクトースによる誘導は、この操作が IPTG 誘導より効率が低いといわれているので、文献において最適に至らないと見なされている。現在まで、ラクトースをインデューサーとして用いる効率のよい発酵法は記載されていない。本発明による実験の試みは、おそい生成物の形成の方が大腸菌の固有の代謝に対して小さい妨害効果を有しているの

で、弱い誘導、即ちおそい生成物の形成の方が生成物の高い最終濃度を達成することができるという考察に基づいている。この試みは、上に比して 2 倍に相当する 2g/l (+/-10%) の生成物濃度が達成された適当な実験において確かめられている。増殖の直線期においてグルコースがラクトースに置き換えられた点で、この方法は IPTG によって誘導される以前の方法と異なっている。発酵の終末における高い代謝活性の範囲内では、10% を超える酸素の分圧を達成するためにラクトースの添加も制限されたとき、この方法の第 3 の変法においてラク

スによる誘導を更にIPTG添加によって助けることが可能であった。この追加のIPTG誘導は、特定の選ばれた発酵装置の入力が培養物に酸素を供給するのに不十分であるときにのみ必要である。上述した第2の方法においてプラスミド損失の増大が観察されるので、スケールアップの際には発酵容量が増大するに従って交差する点があり、ラクトースによる誘導の際プラスミド損失のわずかな増大が観察されるので、その後最初は第2、次に第1の方法の方が経済的である。

生成物の濃度が最大になる時点で発酵を停止する。当業者に知られている処理を使用して生物体を濃縮（例えば分離器中）、崩壊（例えば高圧ホモジナイザー中）させる。細胞フラグメントの沈降の後では、生成物の大部分は透明になった上清中に含まれている。

従って、本発明は、lacプロモーター又は最適化lacプロモーターのコントロール下大腸菌中外来性遺伝子の発現のための最適化発酵法であって、

(1) IPTG、同時に基質制限されたグルコース添加、そしてグルコース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(2) 又は炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトース、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(3) 又は炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトース、そして更にIPTG、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれること  
によって対数増殖期の終末において誘導が行われる方法に関する。

この方法の好ましい変法においては、各々の場合酸素分圧を次の手段のうち1つ又はそれ以上によって増大さ

せる：

(a) 好ましくは2バールまでの、超大気圧下の発酵  
(b) 入力（攪拌速度を増大させること）及び通気速度（2vvmまでの）のコントロールされた追跡

(c) Henry係数の改善及び代謝活性の低下により、酸素移行速度を増大させかつ酸素取込み速度を低下させる（バッチの大きさ（＝容器）が増大すると共に比入力（specific powerinput）が減少するので1,000ℓを超えるスケールアップの際必要）ために温度を37℃から30℃に至るまで低下させること。

炭素源として糖基質の添加が最大値5～10g/ℓにコントロールされること及び全発酵期間pHがpH6.7～pH7.3の範囲にNH<sub>4</sub>OH及びH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>の添加によってコントロールされることは、この方法の変法のすべてに共通である。

上述した方法は、タンパクPP4及びPP4-x（これらはリポコルチンに属する（Grundmannら、Proc.Natl.Acad.Sci.85（1985）3708～3712））、ならびにそれらの突然変異体（mutant）及び変異体（variant）の遺伝子工学的製造に好ましく用いられる。

20 本発明は、実施例及び特許請求の範囲において更に説明されている。

#### 実施例

次の実施例は大腸菌K12株W3110 lac 10（Brent及びPiashne（1981）Proc.Acad.Natl.Sci.USA78,4204～4208）の発酵を記述するもので、この菌株は、プラスミドpTrc99A-PP4（Amannら（1988）Gene69,301～315）又はpTrc99A-PP4-x（Grundmannら（1988）Behring Inst.Mitl.82,59～67）を用いて形質変換されている。

表1は極めて適している培地を示す。

## 表 1

## 生育培地の 1 例の組成

(リットルあたり g 又は mg 単位 of データ)

炭素源(糖)必要に応じ

イーストエキス	20g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1.2g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.5g
KCl	1.0g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.0g
クエン酸	0.25g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5.0g
チアミン	5.0mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.0mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.8mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.16mg
KI	0.4mg
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.02mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.6mg

発酵は 8 ℓ の発酵容量をもつ 10 ℓ の Biostat E ファーメンター (製作者: Braun Melsungen) 中実施された。

発酵の間プラスミド含有細胞に対して選択圧力はかけなかった。即ち発酵は抗生物質の添加なしに実施された。ファーメンターに一夜の振盪フラスコ前培養物を接種した。増殖の初期相において炭素源としてグルコースを用い、この相において 0.1M 未満の酢酸が生成するようにグルコースをはかり入れた。酢酸濃度が増大すると生成物の収量は有意に低下した。増殖の初期相中 10~15 時間後、約 5000 cells の細胞濃度が達成され、生成物形成の誘導は次の 3 つの異なった別の方式で行われた。

(1) 1~10mM の IPTG (好ましくは 5mM の IPTG) の添加後グルコースのはかり入れを継続

増殖の初期相の終末において、炭素源としてグルコ

ス (「基質」) のはかり入れを継続しながら 1~10mM の IPTG (好ましくは 5mM の IPTG) を添加することによって生成物の形成を誘導した。この場合生成物形成の速度は、その時におけるグルコース濃度への明らかな依存性を示した。実際の基質としてグルコース及び外見上の基質として IPTG は競合する基質と思われ、ジオキシの法則に従って、グルコースは lac オペロンの活性化を部分的又は完全に抑制した。この場合 1g/ℓ の PP4 又は PP4-x の収量がグルコース制限系 (0.1g/ℓ 未満のグルコース濃度) において得られた。

グルコースの制限は、ポイントを設置することによるか又はオンライン HPLC 測定を用いて実施された。細胞の増殖速度は、非制限系中誘導によって低下しなかったが、予期されたとおり制限系中グルコース濃度の関数と

して細胞の増殖速度が低下した。関連増殖速度によって、100～15000 $\pm$ の細胞密度に達した。

(2) ラクトースのはかり入れを継続

初期増殖相の終末において、炭素源としてグルコースをラクトースに置き換えることによって生成物の形成を誘導した。ラクトースはlacオペコンの生理的誘導因子であるが、IPTGより小さい完全誘導をもたらす。この誘導相の間、細胞は10000 $\pm$ の細胞密度になるまで増殖し続けた。生成物濃度は1.5g/lの値に達した。

(3) ラクトースのはかり入れ継続及び1～10mMのIPTG (好ましくは5mM) の添加 10

初期増殖相の終末において、炭素源としてグルコースをラクトースに置き換え、更にIPTGを添加することによ

って生成物の形成を誘導した。この場合には、IPTGによって強い誘導がもたらされ、同時に生理的基質ラクトースが利用される。グルコース+IPTGと異なり、この場合には炭素源の正確なはかり入れは不必要である。30g/lまでの過剰のラクトースは生産性に悪影響がない。この誘導の間細胞は同様に10000 $\pm$ の細胞密度になるまで増殖し続けた。発酵の終末における生成物濃度は2.0g/lであった。

プラスミドの安定性は(1)から(3)まで低下するので、特定の発酵バッチサイズの間数としてこれらの方法の1つによって誘導が実施される。

上述した実験において選ばれた発酵パラメーターを表2に要約する。

表 2

発 酵 パ ラ メ ー タ ー

pH :	7.0 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 及び NH <sub>4</sub> OHの添加によってコントロール)
通気速度 :	0.5～2.0vvm
回 転 数 :	1,500rpm
温 度 :	37°C (30°Cまで)
ゲージ圧 :	2.0バールまで
基質濃度 :	グルコース 5.0g/l未満にコントロール、溶存酸素が減少した時制限 ; ラクトース 次ののはかり入れにおいて(30g/l) 未満にコントロール、溶存酸素が減少した時制限。
溶存酸素 :	10%超過